贵州北部四种两栖类乳酸脱氢酶同工酶的比较研究*

李永通 吴至康

（贵州省生物研究所）

摘 要

本文采用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法，研究了贵州北部的四种两栖类动物：细痣疣螈、棘指角蟾、绿臭蛙和小弧斑姬蛙的心、肝、肾等组织的乳酸脱氢酶(LDH)同工酶，发现LDH具有明显的种族特异性和组织特异性，不同种的动物和同种动物的不同组织都有各自的LDH同工酶谱型，可以用它们作为识别物种的附加指标。本文初步探讨了生化分类学与系统分类学的关系。

关键词：两栖动物，乳酸脱氢酶同工酶，系统分类

近年来，利用同工酶来探讨生物群体的遗传、进化、系统分类受到人们的广泛重视（王宗仁等，1988；熊全沫等，1985）。以往对物种的分类一般沿用形态特征作为依据，随着遗传学、免疫学、生物化学等学科的发展，同工酶、染色体遗传学被认为是行之有效的实验分类学方法（赵尔宓等，1981），它们对形态分类学有一定的借鉴作用，同时也是分类学的一个补充和发展（黄生民等，1988）。细痣疣螈 *Tylototriton asperrimus*）、棘指角蟾（*Megophrys spinatus*）、绿臭蛙（*Rana margaratae*）、小弧斑姬蛙（*Miorohyla heymonsi*）是生活在高原上的两栖类，有关它们的分类、生态、习性等前人已做了不少工作（刘承钊等，1961；伍律等，1987），本文报道了该四种动物的LDH同工酶的初步研究结果。

材料和方法

（一）实验动物：四种两栖类：细痣疣螈（2♀，1♂）、棘指角蟾（1♀，3♂）、绿臭蛙（2♂）、小弧斑姬蛙（3♀，2♂）均采自贵州省道真县大沙河地区，所获得的动物均为成体。

---

* 本文承王应祥先生审阅，并提出宝贵意见，谨此致谢。
本文1989年8月2日收到，1990年1月12日修回。

（二）样品制备：临实验前处死动物，取出心、肝、肾等组织，用生理盐水洗去血污，按1∶20(g/ml)的比例在0.01*M*的磷酸缓冲液（pH7.4）中匀浆。然后离心（5000×g）20分钟。取上清液，过滤获得组织匀浆样品。

（三）电泳方法：采用双垂直板状聚丙烯酰胺凝胶电泳分离LDH同工酶。凝胶厚度1.0毫米，面积为160×150平方毫米，共12个样品槽。每个样品槽进样5微升。凝胶T为7%，C为3%。电泳在4°C的冰箱中进行，起始电压为110V，20分钟后调至250V，恒压维持4个小时。

（四）凝胶染色及扫描：电泳结束后，凝胶置37°C水浴中在下列溶液里保温染色60分钟：100毫升磷酸缓冲液（pH7.1）中含氧化型辅酶Ⅰ（NAD^+）50毫克，氯化硝基四氮唑兰（NBT）30毫克，吩嗪二甲酯硫酸盐（PMS）2毫克，乳酸钠（6*M*）0.1毫升，氯化钠2毫克。显带后的凝胶用7%乙酸固定，制成永久胶片，供保存及扫描。扫描采用日本岛津CS-930薄层双波长扫描仪进行，波长为590毫微米。

（五）LDH同工酶的亚基计算：LDH的A和B亚基计算采用Gerald(1972)的方法，即：A亚基$=LDH_5+\frac{3}{4}LDH_4+\frac{1}{2}LDH_3+\frac{1}{4}LDH_2$；B亚基$=LDH_1+\frac{3}{4}LDH_2+\frac{1}{2}LDH_3+\frac{1}{4}LDH_4$。

实 验 结 果

（一）细痣疣螈：在该动物的心肌LDH同工酶的活性顺序为$LDH_1>LDH_2>LDH_3>LDH_4>LDH_5$；肾脏为$LDH_1>LDH_2>LDH_3$；$LDH_4$和$LDH_5$活性很低（表1）。肝脏的LDH同工酶是以$LDH_5$活性最大，$LDH_2$活性最小为特征的。

表1 细痣疣螈心、肝、肾组织LDH同工酶的相对活性及亚基含量(%)

Table 1. The relative activities and subunit contents of LDH isozymes of heart, liver and kidney in *T. asperrimus*

组 织	LDH_1	LDH_2	LDH_3	LDH_4	LDH_5	A亚基	B亚基	A/B
心	31.1	30.3	25.2	8.1	5.2	31.5	68.6	0.46
肝	5.3	1.9	15.1	32.5	45.0	77.4	22.6	3.42
肾	61.2	24.9	13.5	痕	痕	12.9	87.1	0.15

（二）棘指角蟾：检测该动物三种组织中的LDH，根据迁移率的大小，发现这三种组织主要以LDH_2、LDH_3、LDH_5分布为主，LDH_1和LDH_4活性很低（表2）。心肌及肾脏的LDH富含B亚基，肝脏以A亚基为主，该组织LDH_5活性最高。

表 2　棘指角蟾心、肝、肾LDH同工酶的相对活性及亚基含量（%）

Table 2. The relative activities and subunit contents of LDH isozymes of heart, liver and kicl ney in *M.spinatus*

组　织	LDH_1	LDH_2	LDH_3	LDH_4	LDH_5	A亚基	B亚基	A/B
心	痕	38.9	44.0	痕	17.0	48.7	51.3	0.95
肝	0.3	9.1	16.5	痕	73.9	84.4	15.6	5.41
肾	痕	59.2	17.2	0.4	22.9	46.6	53.4	0.87

（三）绿臭蛙：与其余三种两栖类不同，该动物肾脏的 LDH 是以 A 基因表达占优势，A亚基含量大于B亚基，以LDH_5活性最大。心肌的LDH同工酶是以LDH_2活性最大为基本特征；肝脏的LDH主要由LDH_4和LDH_5组成，其它同工酶活性较低(表 3)。

表 3　绿臭蛙心、肝、肾LDH同工酶的相对活性及亚基含量（%）

Table 3. The relative activities and subunit contents of LDH isozymes of heart, liver and kidney in *R.margaratae*

组　织	LDH_1	LDH_2	LDH_3	LDH_4	LDH_5	A亚基	B亚基	A/B
心	0.3	74.1	7.2	8.6	9.2	37.8	62.2	0.61
肝	痕	9.1	痕	15.8	75.0	89.1	10.9	8.20
肾	0.2	31.4	0.6	10.1	57.4	73.1	26.9	2.72

（四）小弧斑姬蛙：本动物三种组织的LDH同工酶酶谱的特点：除了LDH_5外，其余四种同工酶的迁移率都比其它三种两栖类的相应同工酶的高（图 1，2），且LDH_1，LDH_2都有一亚带出现。心肌LDH谱型为$LDH_2>LDH_1>LDH_3>LDH_5>LDH_4$，肾脏为$LDH_1>LDH_5>LDH_2>LDH_4>LDH_3$。肝脏的LDH同工酶以$LDH_5$活性最高，该组织LDH富含A亚基（表4）。

表 4　小弧斑姬蛙心、肝、肾LDH同工酶相对活性及亚基含量（%）

Table 4. The relative activities and subunit contents of LDH isozymes of heart liver and kidney in *M. heymonsi*

组　织	LDH_1	LDH_2	LDH_3	LDH_4	LDH_5	A亚基	B亚基	A/B
心	25.5	35.0	21.3	8.3	9.8	35.4	64.6	0.55
肝	0.5	0.8	1.1	7.8	89.5	96.4	3.6	26.70
肾	55.4	6.4	2.0	2.6	32.5	37.1	62.9	0.59

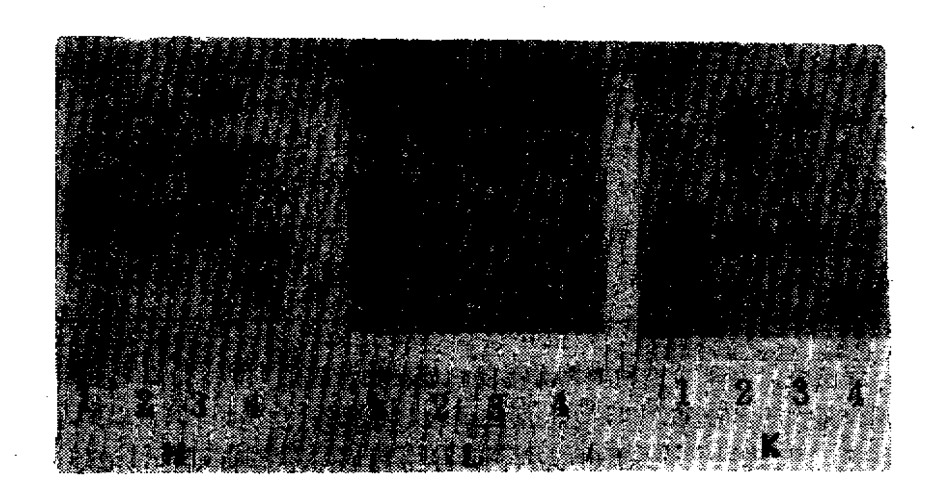


图1　四种两栖类心、肝、肾组织的LDH同工酶酶谱

Fig. 1. LDH isozyme zymograms of tissues: heart, liver and kidney of four species amphibians.
1.细痣疣螈(*Tylototriton asperrimus*)　2.绿臭蛙(*Rana margaratae*)　3.棘指角蟾(*Megophrys spinatus*)　4.小弧斑姬蛙(*Microhyla heymonsi*)
H: 心(Heart)　L: 肝(Liver)　K: 肾(Kidney)

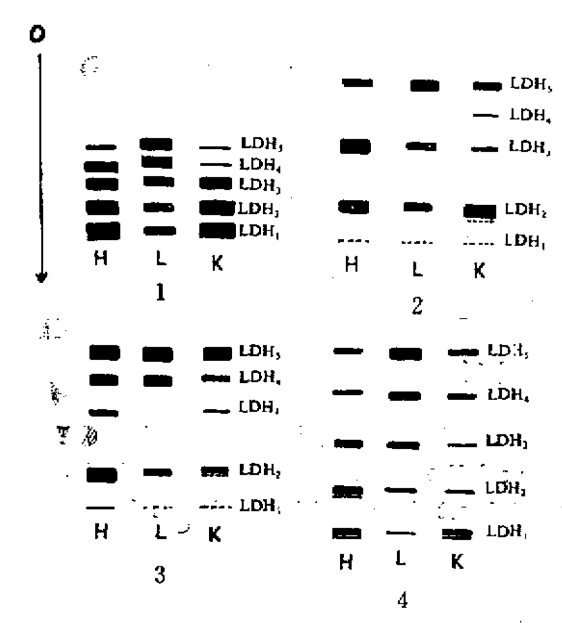


图2　四种两栖类心、肝、肾组织的LDH同工酶酶谱模式

Fig. 2. A model of LDH isozyme zymograms of tissues: heart, liver and kidney of four species amphibians
1.细痣疣螈(*Tylototriton asperrimus*)　2.棘指角蟾(*Megophrys spinatus*)　3.绿臭蛙 (*Rana margaratae*)　4.小弧斑姬蛙(*Microhyla heymonsi*)
H: 心(Heart)　L: 肝(Liver)　K: 肾(Kidney)

讨　论

国内外资料表明：在探讨鱼类、两栖类、鸟类等脊椎动物种间及种内的亲缘关系中，分析LDH同工酶可作为一项生化分类学指标（黄生民等，1988；杨玉华等，1983；Sharma，1986）。赵尔宓等（1981）认为生化指标在研究蝮蛇种内及种间的分类关系时，具有重复性高，不受季节、个体差异的影响等优点。王宗仁等（1988）在分析 8 种动物血清蛋白的电泳研究中指出：纲与纲、目与目之间的动物血清蛋白中特有蛋白质的比例数随着起源时间由远到近有增大的趋势，而在科与科之间则相反。细痣疣螈隶属于有尾目，内部解剖结构明显地不同其余的三种两栖类，它在酶谱上呈现出一组迁移间隔较小的同工酶，而小弧斑姬蛙则相反，它的五种LDH同工酶间的迁移距离较大，这种差别可能与它们的进化地位及生态习性有关。从酶谱的强弱及迁移特征来看，绿臭蛙靠近小弧斑姬蛙，而棘指角蟾与细痣疣螈更相似。此外，在四种动物的肝脏LDH同工酶中，A亚基的相对含量具有小弧斑姬蛙＞绿臭蛙＞棘指角蟾＞细痣疣螈的特征。这些结果与以形态为特征的系统分类学相一致（田婉淑等，1986），揭示了物种间形态与遗传的一定内在关系，说明蛋白质分子上的生化遗传学特征可作为系统分类学的一项很有价值的参考指标。

参 考 文 献

王宗仁、贾凤兰　1988　八种动物血清蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳和在进化中相互关系。遗传学报　15（4）：290—298。

田婉淑、江耀明　1986　中国两栖爬行动物鉴定手册。科学出版社。

伍律等　1987　贵州两栖类志。贵州人民出版社。

杨玉华　1983　我国大蟾蜍(*Bufo bufo*)三个亚种的 C-带、Ag-NOR 以及血清蛋白、乳酸脱氢酶 (LDH) 同工酶电泳的比较研究。两栖爬行动物学报　2（2）：1—9。

刘承钊、胡淑琴　1961　中国无尾两栖类。科学出版社。

赵尔宓等　1981　我国蝮属蛇毒的聚丙烯酰胺凝胶电泳比较——兼论蛇毒电泳在毒蛇分类上的应用价值。动物学报　27(3)：213—217。

黄生民等　1988　滇池高背鲫和方正银鲫酯酶、乳酸脱氢酶同工酶的比较研究。动物学研究　9（1）：69—78。

熊全沫、夏盛林　1985　中国鳅脂鱼同工酶的研究。动物学报　31（1）：20—28。

Gerald P.C　1972　LDH Isozymes. *Standard Methods of Clinical Chemistry*　7：49—61.

Markert C.L *et al.*　1975　Evolution of a gene：Multiple genes for LDH isozymes provide a model of the evolution of gene structure, function, and regulation. *Science*　189：102—114.

Sharma GP *et al.* 1986 Serum LDH enzymes in studying interspecific relationship in birds. *The Nucleus* 129(1,2)：36—39.

LDH ISOZYME COMPARATIVE STUDIES OF VARIOUS TISSUES IN FOUR SPECIES OF AMPHIBIANS

Li Yongtong Wu Zhikang

(Guizhou Institute of Biology)

This paper dealt with LDH isozymes of heart, liver, kidney of amphibians: *Tylototriton asperrimus*, *Megophrys spinatus*, *Rana margaratae* and *Microhyla heymonsi* by using polyacrylamide gel electrophoresis and optical density scanning. There were different type LDH isozymes in each tissues of all animals. The results indicated that LDH isozymes had tissue specificity and different LDH zymograms in each tissue of the animals. Animals may be identified by special zymograms. The LDH molecule evolution and LDH relationship with systematics were discussed too.

Key words: Amphibian, Lactic dehydrogenase isozyme, Systematics